



PCT

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 G06F 15/40		A1	(11) 国際公開番号 WO 93/20525
		(43) 国際公開日 1993年10月14日 (14.10.1993)	国際調査報告書
(21) 国際出願番号 PCT/J P93/00365 (22) 国際出願日 1993年3月26日 (26. 03. 93) (30) 優先権データ 特願平 4/119484 1992年3月27日 (27. 03. 92) JP (71) 出願人; および (72) 発明者 板井昭子 (ITAI, Akiko) (JP/J P) 〒113 東京都文京区本郷5-16-6 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 山田実穂 (YAMADA, Miho) (JP/J P) 〒112 東京都文京区春日2-11-1 森田アパート201 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 中村 稔, 外 (NAKAMURA, Minoru et al.) 〒100 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル646号 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IE (欧州特許), IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), PT (欧州特許), SE (欧州特許), US.		添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title : METHOD OF SEARCHING THE STRUCTURE OF STABLE BIOPOLYMER-LIGAND MOLECULE COMPOSITE (54) 発明の名称 生体高分子-リガンド分子の安定複合体構造の探索方法 a. ligand-bonding region b. biopolymer c. selection of hydrogen-bonding functional group d. calculation of information on three-dimensional lattice point e. positioning of dummy atom f. dummy atom g. hydrogen-bonding region h. hydrogen-bonding functional group of biopolymer i. hydrogen-bonding heteroatom matched with dummy atom j. ligand molecule k. hydrogen-bonding portion l. non-hydrogen-bonding portion m. generation of conformation of hydrogen-bonding portion n. coincidence of distances o. bond rotation p. substitution of coordinate system of ligand molecule q. three-dimensional point r. generation of conformation of non-hydrogen-bonding portion			
(57) Abstract A method of searching the structure of a stable composite composed of a biopolymer and ligand molecules, which method comprises: (1) the first step of covering all modes of hydrogen bonding between a biopolymer and ligand molecules by covering all of the possible combinations of matching between dummy atoms positioned at the hydrogen-bonding heteroatoms of the hydrogen-bonding functional groups of the biopolymer and the hydrogen-bonding heteroatoms of the ligand molecules; (2) the second step of estimating the modes of hydrogen bonding between the biopolymers and the ligand molecules and the conformations of the hydrogen-bonding portions of the ligand molecules at the same time by comparing the distance between the dummy atoms with that between the hydrogen-bonding heteroatoms; and (3) the third step of finding the structure of a biopolymer-ligand molecule composite by substituting the coordinates of all the atoms of the ligand molecules on the basis of the relation of matching between the hydrogen-bonding heteroatoms of the ligand molecules and the dummy atoms for each of the modes of hydrogen bonding and the conformations estimated in the second step into the coordinate system of the biopolymer. This method permits the structure of a stable biopolymer-ligand molecule composite to be searched efficiently and accurately in a short time.			

BEST AVAILABLE COPY

- (1) 生体高分子中の水素結合性官能基の水素結合の相手となり得るヘテロ原子の位置に設定したダミー原子とリガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子との対応づけを組合せ的に網羅することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式を網羅する第1工程、
- (2) 前記のダミー原子間の距離と前記の水素結合性ヘテロ原子間の距離を比較することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式及びリガンド分子の水素結合性部分の配座を同時に推定する第2工程、及び
- (3) 第2工程で得られた水素結合様式と配座毎に、リガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子とダミー原子との対応関係に基づいてリガンド分子の全原子の座標を生体高分子の座標系に置き換えることにより生体高分子ーリガンド分子の複合体構造を得る第3工程
- を含む生体高分子ーリガンド分子の安定複合体の構造を探索する方法。
- 本発明の方法により、短時間で、効率的にかつ精度良く、生体高分子ーリガンド分子の安定複合体の構造を探索することができる。

## 情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	MW	マラウイ
AU	オーストラリア	GA	ガボン	NL	オランダ
BB	バルバドス	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BE	ベルギー	GN	ギニア	NZ	ニュージーランド
BF	ブルキナ・ファソ	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BG	ブルガリア	HU	ハンガリー	PT	ポルトガル
BJ	ベナン	IE	アイルランド	RO	ルーマニア
BR	ブラジル	IT	イタリア	RU	ロシア連邦
CA	カナダ	JP	日本	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KR	大韓民国	SK	スロヴァキア共和国
CH	スイス	KZ	カザフスタン	SN	セネガル
CI	コート・ジボワール	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソヴィエト連邦
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TD	チャード
CS	チェコスロヴァキア	LU	ルクセンブルグ	TG	トーゴ
CZ	チェコ共和国	MC	モナコ	UA	ウクライナ
DE	ドイツ	MG	マダガスカル	US	米国
DK	デンマーク	ML	マリ	VN	ベトナム
FI	フィンランド	MN	モンゴル		
ES	スペイン	MR	モーリタニア		

## 明 細 書

## 生体高分子ーリガンド分子の安定複合体構造の探索方法

## 技術分野

本発明は、医薬、農薬、その他の生理活性化合物の構造設計に利用できる生体高分子ーリガンド分子の安定複合体構造の探索方法に関する。

## 背景技術

薬物や生体内活性物質が生理活性を発現するには、標的となる生体高分子（細胞間のシグナル伝達に關与する薬理学的受容体だけでなく、酵素、サイトカイン蛋白その他の蛋白質、およびそれらを主成分とする複合体、核酸を含む）に強く結合することが必要である。1960年以降、数多くの生体高分子の立体構造がX線結晶構造解析によって原子レベルで明らかにされ、その成果はプロテインデータバンクに収められて公開されている。

これら生体高分子に結合する低分子量の化合物分子（薬物分子、酵素の基質・阻害剤・補酵素分子、その他）をリガンド分子と呼ぶ。リガンド分子としては、薬物分子の候補、例えばこれから合成しようとする薬物分子も含む。

こうした生体高分子とリガンド分子の安定な結合には、生体高分子の立体構造中にあるリガンドを結合する溝や窪み（リガンド結合部位と呼ぶ）の形状とリガンド分子の表面の形状がカギ穴とカギのように相補的になっていること、及び、両分子の間に特別な親和力をもたらす相互作用が働くことが必要である。これらの分子間相互作用の中で水素結合、静電相互作用、疎水相互作用などが特に重要なことが、生体高分子とリガンド分子の複合体の結晶解析によって知られている。ある任意の化合物分子が、標的の生体高分子と安定な複合体を形成できるかどうか、できるとしたらどのような結合様式（生体高分子のリガンド結合部位のどの官能基が、リガンド分子のどの官能基とどのような相互作用しているか）の複合体なのか、それがどの程度安定な複合体かを知ることは、薬物設計や構造活性相関において極めて重要である。安定な結合様式を探ることは、配座変化の自由度

のあるリガンド分子にあっては、標的生体高分子に結合した時の分子配座（活性配座）を同時に決定することを意味し、これもまた薬物設計に重要である。

複合体として自由エネルギー的に最も安定な構造をとる際には、リガンド分子の構造は、リガンド分子単独での結晶構造、溶液中での構造、各種エネルギー計算で得られるエネルギー最安定（または極小）構造とは異なることが多いことが知られている。

すべての興味あるリガンド分子について、X線結晶解析など実験的な手法で生体高分子との結合様式を決定することは不可能である。1つ1つのリガンド分子について生体高分子との結合様式を実験的な手法で解析することは多大の労力と時間を必要とすることが第1の理由であるが、リガンド分子が酵素基質である場合には、酵素反応が進んでしまうために安定複合体構造が実験で検出できない場合もあるし、リガンド分子である化合物が実在はしても入手が困難なこともあるからである。さらに架空のリガンド分子化合物について生体高分子との結合様式と複合体の安定性を予測し、実際に合成してみる価値があるかどうかを判断することが要求されることもある。このような予測は、特に、分子設計によって、新しい薬物や活性物質を考案する場合において極めて有用性が高い。

立体構造が既知の生体高分子に対する、任意の構造のリガンド分子の安定な結合様式をシミュレートする研究や作業をドッキングスタディと呼ぶ。従来、ドッキングスタディは、分子模型を使って行なわれてきたが、分子模型を組み立てる時間や労力がかかること、模型の精度や結果の再現性が低いこと、及び定量性がないといった問題点があった。このような問題点を解決する方法として、最近ではコンピュータとコンピュータグラフィックスを用いたシミュレーション手法が一般に用いられている。

コンピュータとコンピュータグラフィックスを用いたシミュレーション手法においては、コンピュータグラフィックス画面上で対話的に、視覚的な判断によって大まかな初期複合体構造を設定したのちに、計算科学的に精密化、定量化することが最も一般的に行なわれている。しかし、このやり方では、結合様式や分子配座について作業者の先入観が入り易く、客観的に膨大な可能性の中から正しい解に到達することが極めて難しい上に、時間と労力がかかる。また、作業者によ

って結果が異なるなど、結果の信頼性や再現性にも欠ける。

このような問題点を解決するために、作業者の主観が介入しないですむ方法について2、3の研究がなされている。Kuntzらは、リガンド分子を数個の球で近似的に表現し、分子配座の自由度の代わりに複数の球の相対的關係を変化させつつ、受容体のリガンド結合部位にフィットするかどうかを判定するプログラムを発表している (Docking Flexible Ligands to Macromolecular Receptors by Molecular Shape, R.L. Des Julais, R.P. Sheridan, J. Scott Dixon, I.D. Kuntz、及びR. Venkataraghavan: J. Med. Chem. (1986) 29, 2149-2153)。しかし、この方法は水素結合をはじめとする特異的な分子間相互作用を扱うことができないので、安定な複合体を形成する結合様式や配座を確実に決定するには有効でない。

また、F. Jiang らは、Kuntz らの注目した形状の相補性の他に水素結合性、静電相互作用などの分子間相互作用を定性的に考慮した自動ドッキング法を考案した (F. Jiang, S. Kim, J. Mol. Biol. 219, 79 (1991))。しかし、この方法は、リガンド分子の配座の自由度を考慮していない上に、分子間相互作用に関する定量的な評価が不十分である。

他の方法も研究されているが、いずれも、分子間の特異的相互作用が考慮されてなかったり、リガンド分子の配座の自由度が考慮されず、はじめに与えた配座 (単独での結晶構造など) でしかドッキング状態が探索出来ないなどの欠点を有し、有効な方法にはなっていない。一般に、生体高分子に対するリガンド分子の結合様式とリガンド分子の活性配座は完全にカップルしているので、その両方を考慮しないと意味がない。結合様式と活性配座は、それぞれに膨大な数の可能性があり得、その全ての組合せを考慮しないと、可能な複合体構造を網羅したことにならないが、結合様式と活性配座の全ての組合せを考慮した複合体構造の探索方法は今だに確立されていない。

従って、本発明は、上記の問題点を解決した、生体高分子ーリガンド分子の安定複合体構造の探索方法を提供することを目的とする。

また、本発明は、生体高分子に対するリガンド分子の結合様式とリガンド分子の活性配座を同時に探索することができる方法を提供することを目的とする。

## 発明の開示

本発明者らは、鋭意努力した結果、生体高分子ーリガンド分子間の相互作用として、水素結合、静電相互作用、及びファンデルワールス力を考慮して安定複合体の結合様式を探索すると同時にリガンド分子の活性配座を探索することによって、任意のリガンド分子を生体高分子のリガンド結合領域に自動的にドッキングさせる方法を開発して、上記の課題を解決することに成功した。すなわち、本発明は、

(1) 生体高分子中の水素結合性官能基の水素結合の相手となり得るヘテロ原子の位置に設定したダミー原子とリガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子との対応づけを組合せ的に網羅することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式を網羅する第1工程、

(2) 前記のダミー原子間の距離と前記の水素結合性ヘテロ原子間の距離を比較することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式及びリガンド分子の水素結合性部分の配座を同時に推定する第2工程、及び

(3) 第2工程で得られた水素結合様式と配座毎に、リガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子とダミー原子との対応関係に基づいてリガンド分子の全原子の座標を生体高分子の座標系に置き換えることにより生体高分子ーリガンド分子の複合体構造を得る第3工程

を含む生体高分子ーリガンド分子の安定複合体の構造を探索する方法を提供するものである。

また、本発明は、

(1) 生体高分子中の水素結合性官能基の水素結合の相手となり得るヘテロ原子の位置に設定したダミー原子とリガンド分子の部分構造中の水素結合性ヘテロ原子との対応づけを組合せ的に網羅することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式を網羅する第1工程、

(2) 前記のダミー原子間の距離と前記の水素結合性ヘテロ原子間の距離を比較することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式及びリガンド分子の部分構造の配座を同時に推定する第2工程、

(3) 第2工程で得られた水素結合様式と配座に基づいて、前記のリガンド分子

の部分構造中で不可能な水素結合様式を与えるダミー原子と水素結合性ヘテロ原子の組合せ、及びダミー原子と水素結合を形成し得ない水素結合性ヘテロ原子を保存する第3工程、

(4) 第3工程で保存された水素結合性ヘテロ原子を含む組合せ、及び第3工程で保存されたダミー原子と水素結合性ヘテロ原子の組合せを除いて、ダミー原子とリガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子との対応づけを組合せ的に網羅することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式を網羅する第4工程、

(5) 前記のダミー原子間の距離と前記の水素結合性ヘテロ原子間の距離を比較することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式及びリガンド分子の水素結合性部分の配座を同時に推定する第5工程、及び

(6) 第5工程で得られた水素結合様式と配座毎に、リガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子とダミー原子との対応関係に基づいてリガンド分子の全原子の座標を生体高分子の座標系に置き換えることにより生体高分子ーリガンド分子の複合体構造を得る第6工程

を含む生体高分子ーリガンド分子の安定複合体の構造を探索する方法を提供するものである。この方法により、生体高分子ーリガンド分子の安定複合体構造の探索の高速化が図れ、また、生体高分子及び／又はリガンド分子が複雑な構造を有する場合にも、安定な複合体の構造を短時間に探索することが可能となる。

さらにまた、本発明は、

(1) 生体高分子中の水素結合性官能基の水素結合の相手となり得るヘテロ原子の位置に設定したダミー原子とリガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子との対応づけを組合せ的に網羅することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式を網羅する第1工程、

(2) 前記のダミー原子間の距離と前記の水素結合性ヘテロ原子間の距離を比較することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式及びリガンド分子の水素結合性部分の配座を同時に推定する第2工程、

(3) 第2工程で得られた水素結合様式を保持しつつ、ダミー原子とリガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子の位置が一致するようにリガンド分子の配座を最適化し、次いで、分子内エネルギーの高いリガンド分子の配座を除去する第3工程、

(4) 第3工程で除去されなかった配座毎に、リガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子とダミー原子との対応関係に基づいてリガンド分子の全原子の座標を生体高分子の座標系に置き換えることにより生体高分子ーリガンド分子の複合体構造を得る第4工程、

(5) 第4工程で得られた複合体構造から、リガンド分子中の水素結合性部分の分子内エネルギー及び生体高分子ー該リガンド分子中の水素結合性部分の分子間相互作用エネルギーの高い複合体構造を除去し、次いで、残った複合体構造について構造の最適化を行う第5工程、

(6) 第5工程で得られた複合体構造毎に、リガンド分子の非水素結合性部分の配座を発生させて新たな複合体構造を得る第6工程、及び

(7) 第6工程で得られた複合体構造から、リガンド分子全体の分子内エネルギー及び生体高分子ーリガンド分子の分子間相互作用エネルギーの高い複合体構造を除去し、次いで、残った複合体構造について構造の最適化を行う第7工程を含む生体高分子ーリガンド分子の安定複合体の構造を探索する方法を提供するものである。この方法により、生成させる配座の数を少なくしても適切な複合体構造の選択が可能となり、精度のよい安定複合体が得られる。

本発明において、生体高分子とは、生体に見出される高分子の他、生体に見出される高分子を模擬した分子をも含む概念である。

水素結合性官能基とは、水素結合に関与すると考えられる官能基及び原子を含む概念である。

水素結合性ヘテロ原子とは、リガンド分子中に存在する水素結合性官能基を構成するヘテロ原子をいうものとする。

水素結合性部分とは、リガンド分子の構造のうち、ダミー原子と対応づけられる水素結合性ヘテロ原子を含む構造部分をいうものとし、非水素結合性部分とは、水素結合性部分以外の構造部分をいうものとする。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の方法における主要なステップを模式的に示したものである。

第2図は、本発明の方法のフローチャートを示す。図中、Sは各ステップを示



す。

第3図は、メトトレキセート (MTX) 及びジヒドロ葉酸 (DHF) の分子構造を示す。図中、丸で囲った原子は水素結合性ヘテロ原子であり、a～dは、系統的に回転させる結合を示す。

第4図は、本発明の方法により得られた、ジヒドロ葉酸還元酵素－メトトレキセート複合体の最安定モデルの構造を示す。図中、太線はメトトレキセートの分子構造を、細線はジヒドロ葉酸還元酵素の分子構造の一部を示す。

第5図は、入力構造として用いた単独時の結晶構造中のメトトレキセートの配座 (a)、本発明の方法により得られた、ジヒドロ葉酸還元酵素－メトトレキセート複合体の最安定モデル中のメトトレキセートの配座 (b)、及びジヒドロ葉酸還元酵素－メトトレキセート複合体の結晶構造中のメトトレキセートの配座 (c) を示す。

第6図は、ジヒドロ葉酸還元酵素反応の立体特異性を示す。

第7図は、本発明の方法により得られた、ジヒドロ葉酸還元酵素－ジヒドロ葉酸複合体の最安定モデルの構造を示す。図中、太線はジヒドロ葉酸の分子構造を、点線はジヒドロ葉酸還元酵素の分子構造の一部を示す。

第8図は、ジヒドロ葉酸還元酵素－メトトレキセート複合体の結晶構造中のメトトレキセートのジヒドロ葉酸還元酵素への結合様式の模式図 (a) と、ジヒドロ葉酸還元酵素反応生成物の立体特異性から推定されるジヒドロ葉酸のジヒドロ葉酸還元酵素への結合様式の模式図 (b) を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

第2図のフローチャートを参照して、本発明の好ましい実施態様について説明する。なお、第2図において、Sは各ステップを示す。

まず、生体高分子を構成する原子の番号と原子座標 (但し、水素原子の原子座標は除く。) を入力する (S1)。

生体高分子の原子座標は、X線結晶解析やNMR解析により得られた立体構造から算出するか、蛋白質結晶データベース等を利用して入手するか、またはこれらの情報をもとに構築された生体高分子モデルの原子座標を用いることができる。

この原子座標は、三次元座標系で表されることが好ましい。また、生体高分子に結合して構造的にも機能的にも重要な役割を果たす補因子を生体高分子の一部として見做して、該補因子を結合した状態の生体高分子の原子座標を入力して、以後のステップを行ってもよい。上記の補因子としては、補酵素、水分子、鉄イオン等を挙げることができる。

次に、前記の生体高分子中に存在するアミノ酸残基を構成する水素原子の原子座標を算出する（S2）。

一般に、生体高分子の水素原子の位置は、X線結晶解析やNMR解析等の実験的手法では求められず、また、蛋白質結晶データベース等からも水素原子に関する情報は入手できないので、生体高分子中に存在するアミノ酸残基の構造に基づいて、該アミノ酸残基を構成する水素原子の原子座標を算出する。回転可能なアミノ酸残基に結合しているために、その原子座標を一義的に決定できない水素原子は、トランス位に存在すると仮定して原子座標を算出することが好ましい。

次に、生体高分子中に存在するアミノ酸残基を構成する原子に電荷を付加する（S3）。

この電荷の値としては、各アミノ酸について算出されている文献値、例えば、Weinerの値 (Weiner, S.J., Kollman, P.A., Case, D.A., Singh, U.C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S., Jr. and Weiner, P., J. Am. Chem. Soc., 106 (1984)765-784)を用いることができる。

次に、生体高分子中に存在する水素結合性官能基を構成するヘテロ原子について、水素結合番号を付加する（S4）。

水素結合番号は、以下の表1に従って、付加することができる。

表 1. 水素結合性官能基を構成する原子の種類と水素結合番号

水素結合番号	水素結合性官能基を構成する原子の種類
1	第一アミンの $sp^2$ のN
2	第一アミンの $sp^3$ のN
3	アンモニウムイオンの $sp^3$ のN
4	アミドの $sp^2$ のN
5	第二アミンの $sp^3$ のN
6	芳香族のN
7	プロトン化した芳香族のN
8	第三アミンのN
9	プロトン化した第三アミンのN
10	C-O結合の回転可能なヒドロキシルのO
11	エーテルのO
12	カルボニルのO
13	カルボシキレートアニオンのO
14	カルボン酸のO
15	ホスフェートのO
16	水分子のO
17	メルカプトのS
18	チオエーテルのS
19	水素の位置が固定したヒドロキシのO

次に、リガンド結合領域を指定する (S 5)。

上記の領域としては、生体高分子の任意の部位を含む領域を選択することができる。目的に応じて、リガンド結合ポケット、その周辺の生体高分子の部位、及び、必要に応じて、エフェクター等の他の分子の結合する生体高分子の部位を含む領域を、例えば、第 1 図の(a)に示すように、直方体として指定することができる。

る。リガンド結合ポケットとは、生体高分子の凹んだ分子表面にあり、基質や阻害剤などのリガンド分子が結合する内孔をいう。

リガンド結合領域の範囲の指定には、プログラムGREEN (Journal of Computer Aided Molecular Design, vol.1, pp.197-210 (1987), Nobuo Tomioka, Aiko Itai, and Yoichi Iitaka)の機能の一部を利用することができる。

S 5 で指定した領域内に三次元格子点を発生させ、各三次元格子点につき、番号付けと格子点情報の算出を行う (S 6)。

三次元格子点とは、生体高分子のリガンド結合領域内の一定間隔毎に発生させる三次元格子点上の点をいうものとする。格子点情報とは、各三次元格子点上にプローブとなる原子があるとして算出した生体高分子とプローブ原子の間に働くファンデルワールス相互作用エネルギー及び静電相互作用エネルギー、並びに水素結合性等のリガンド結合領域の局所的な物理化学的情報を含む概念である。

この三次元格子点の格子点情報を利用することにより、以後のステップで行う生体高分子とリガンド分子の分子間相互作用エネルギーの近似計算の高速化が可能となり、また、以後のステップで設定するダミー原子の位置を合理的に決定することが可能となる。その結果、生体高分子とリガンド分子のドッキングモデルを短時間に網羅的に探索できるようになる。

三次元格子点は、0.3～2.0 オングストローム、好ましくは、0.3～0.5 オングストロームの一定間隔でS 5 で指定した領域内に発生させてよい。

プローブ原子としては、リガンドとなる可能性のある化合物に含まれるすべての原子種を採用することが好ましい。

各三次元格子点に配置した各プローブ原子と生体高分子との間に働くファンデルワールス相互作用エネルギーは、実験的なポテンシャル関数を用いて常法の原子対計算により算出することができる。実験的なポテンシャル関数としては、以下の式で表されるようなLennard-Jones type関数を用いることができる。

$$G_{vdw, i} = \sum_j (A / r_{ij}^{12} - B / r_{ij}^6)$$

(式中、i はプローブ原子の位置を示す番号を、j は生体高分子の原子の番号を表す。A及びBは極小のポテンシャルの位置と大きさを決定するパラメーターを表す。r<sub>ij</sub>は、i 番目に配置したプローブ原子と生体高分子の j 番目の原子との

間の距離を表す。)

リガンド分子をこの三次元格子点上に置いた時の、リガンド分子-生体高分子間のファンデルワールス相互作用エネルギーは、以下の式から算出することができる。

$$E_{vdw} = \sum_{m=1}^N G_{vdw, m0}$$

(式中、mはリガンド分子中の原子の番号であり、Nはリガンド分子中の原子の数であり、m<sub>0</sub>はm番目の原子に最も近い三次元格子点の番号である。)

上記のA及びBのパラメーターとしては、Weinerらの値 (Weiner, S.J., Kollman, P.A., Case, D.A., Singh, U.C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S., Jr. and Weiner, P., J. Am. Chem. Soc., 106(1984)765-784) を用いることができる。

各三次元格子点に配置した各プローブ原子と生体高分子との間に働く静電相互作用エネルギーは、以下の式から算出することができる。

$$G_{e, i, j} = \sum_j K q_j / \epsilon r_{ij}$$

(式中、i、j、及びr<sub>ij</sub>は、前に定義した通りであり、q<sub>j</sub>は生体高分子のj番目の原子の電荷を、Kはエネルギー単位を変換するための定数を、εは誘電率を表す。)

上記の誘電率として、一定の値を用いてもよいが、Warshel らが提案しているようなr<sub>ij</sub>に依存した値 (Warshel, A., J. Phys. Chem., 83 (1979) 1640-1652) を用いることが好ましい。

リガンド分子をこの三次元格子点上に置いた時の、リガンド分子-生体高分子間の静電相互作用エネルギーは、以下の式から算出することができる。

$$E_{e, i, c} = \sum_{m=1}^N q_m G_{e, i, c, m0}$$

(式中、m、N、及びm<sub>0</sub>は上で定義した通りである。)

水素結合性とは、その三次元格子点に水素供与性の原子又は水素受容性の原子のどちらの原子が配置されれば、生体高分子の水素結合性官能基と水素結合を形成し得るか、あるいは、どちらの原子が配置されても生体高分子の水素結合性官能基と水素結合を形成し得ないことに関する情報をいう。

三次元格子点の水素結合性は以下のようにして求めることができる。ある三次

元格子点Pと、生体高分子中に存在するある水素供与性原子Dとの間の距離 $DP$ が水素結合を形成し得る距離（例えば、2.5～3.1オングストローム）であり、かつ、P、水素H、及びDがなす角度 $\angle DHP$ が水素結合を形成し得る角度（例えば、 $30^\circ$ 以上）であれば、この三次元格子点は水素受容性であると見做してよい。同様に、ある三次元格子点Pと、生体高分子中に存在するある水素受容性原子Aとの間の距離 $DA$ が水素結合を形成し得る距離であり、かつ、P、孤立電子対L、及びAがなす角度 $\angle ALP$ が水素結合を形成し得る角度であれば、この三次元格子点は水素供与性であると見做してよい。ある三次元格子点が、水素受容性でも、水素供与性でもない場合は、水素結合性は無いと見做してよい。水素受容性である三次元格子点に1、水素供与性である三次元格子点に2、水素結合性のない三次元格子点に0の番号を付加することにより、三次元格子点の水素結合性を表すことができる。

生体高分子中に存在する水素結合性官能基であって、S5で指定した領域内に存在するものの中から、リガンド分子と水素結合を形成することが予想されるものを選択する（S7）。

複数の水素結合性官能基が存在する場合には、その重要度に応じて選択する。

S6で算出した三次元格子点の格子点情報に基づいて、S7で選択した各水素結合性官能基に対してダミー原子を設定する（S8）。

このステップは、まず、S6で算出した三次元格子点の水素結合性に基づいて、S7で選択した各水素結合性官能基と水素結合を形成し得る領域（以下、「水素結合性領域」という。）を決定し、次いで、水素結合性領域内でかつ、他の原子のファンデルワールス半径外に、適当な数、例えば5～20個の三次元格子点が存在する水素結合性領域を構成する三次元格子点の中心にダミー原子を配置することにより行うことができる。水素結合性領域は、同じ水素結合性を有し、互いに隣接する一群の三次元格子点から構成される領域である。

ダミー原子には、その中心に該ダミー原子を配置した三次元格子点と同じ水素結合性を与えておく。

1個の水素結合性官能基から2個以上のダミー原子が設定されたり、1個のダミー原子も設定されなかったりする。

次に、リガンド分子を構成する原子について、番号、原子名、原子タイプ番号、原子座標、電荷、及び、その原子が水素結合性ヘテロ原子である場合には水素結合番号を入力する (S 9)。

リガンド分子を構成する原子の原子タイプ番号は、Weinerら(Weiner, S. J., Kollman, P. A., Case, D. A., Singh, U. C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S., Jr. and Weiner, P., J. Am. Chem. Soc., 106(1984)765-784) の行った番号付けに従うことが好ましい。

リガンド分子の原子座標は、単独の結晶の構造解析、結晶データベースやエネルギー計算を基にしたモデルビルディングより得られた立体構造等から算出することができる。リガンド分子の原子座標が表す立体構造は、基本的には、原子間の結合距離、結合角等の幾何学的な量さえ正確であれば、配座は全く問題としない。しかし、リガンド分子を構成する各原子の電荷をできるだけ正確に算出するためには、ある程度単独で安定な立体構造を与える原子座標を入力することが好ましい。

リガンド分子を構成する各原子の電荷は、MOPAC プログラム中のMNDO法やAM1法を用いて分子軌道法計算により算出することができる。

リガンド分子中に存在する水素結合性ヘテロ原子の水素結合番号は、前記の表 1 に従って、付加することができる。

リガンド分子の種類を変えて、S 9 ~ S 31 のステップを繰り返すことにより、同じ生体高分子に対する種々のリガンド分子の結合様式を探索することができる。

生体高分子とリガンド分子との間に形成される水素結合の数の最小値  $l_{min}$  と最大値  $l_{max}$  を指定する (S 10)。

これらの値としては任意の値を設定してよいが、生体高分子と既知のリガンド分子が形成する水素結合の数から予想される値の前後の値を指定することが好ましい。

リガンド分子について、ねじれ回転が可能な結合とその回転の様式を指定する (S 11)。

ねじれ回転可能な結合が単結合の場合は、 $10^{\circ} \sim 120^{\circ}$  の一定の回転角で系統的に回転させる回転様式を指定することが好ましい。ねじれ回転可能な結合

が環構造内にある場合には、可能な種々の環構造を順次ファイルから入力していく方法を指定することが好ましい。

ダミー原子と、リガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子との間に対応関係をつける (S 1 2)。

ダミー原子の数を  $m$  個、リガンド分子中に存在する水素結合性ヘテロ原子の数を  $n$  個とすると、 $i$  個の水素結合を形成する対応関係 (組合せ) の数  $N(i)$  は、 $m P_i \times n C_i$  (式中、 $P$  は順列、 $C$  は組合せを表す。) 個となる。ダミー原子と、リガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子の可能な組合せをすべて選択することが好ましい。

$l_{min} \leq i \leq l_{max}$  の関係を満たすすべての  $i$  について、S 1 2 ~ S 3 0 のステップを繰り返す。その結果、ダミー原子と、リガンド分子中に存在する水素結合性ヘテロ原子との  $\sum_{i=l_{min}}^{l_{max}} N(i)$  個の組合せがすべて選択されることとなる。これによって、生体高分子とリガンド分子が形成する水素結合の全組合せが選択されることになり、生体高分子とリガンド分子の結合様式を系統的に、また効率的に探索できるようになる。

S 1 2 で対応関係をつけた、ダミー原子とリガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子との組合せの一つを選択する (S 1 3)。

この時、ダミー原子の水素結合性とリガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子の水素結合性が一致しない組合せは選択しない。

S 1 2 で対応関係をつけたすべての組合せについて、S 1 3 ~ S 3 0 のステップを繰り返す。

次に、S 1 3 で選択した組合せに含まれるダミー原子について、各ダミー原子間の距離を算出する (S 1 4)。

ダミー原子の数及びリガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子の数の両方が 1 個の場合は、S 1 4 ~ S 2 1 のステップを行わずに、S 2 2 のステップへ飛び、次いで、S 2 3 ~ S 2 5 のステップを行わずに、S 2 6 のステップへ飛ぶ。また、ダミー原子の数又はリガンド分子中に存在する水素結合性ヘテロ原子の数のどちらか一方が 1 個の場合は、S 1 4 ~ S 2 1 のステップを行わずに、S 2 2 のステップへ飛ぶ。



次に、リガンド分子を、水素結合性部分と非水素結合性部分に分割する(S 1 5)。

例えば、第1図の(b)のようにリガンド分子を水素結合性部分と非水素結合性部分に分割する。

S 1 5で分割したリガンド分子の水素結合性部分について、ねじれ回転が可能な結合とその回転の様式を選択する(S 1 6)。

S 1 6で選択した結合を、S 1 1で指定したその回転様式に従って回転させることによって、リガンド分子の配座を順次生成させる(S 1 7)。

生成した配座毎に、以後のS 1 8～S 3 0のステップを繰り返す。

S 1 7で生成した配座について、S 1 3で選択した組合せに含まれるリガンド分子中の各水素結合性ヘテロ原子の原子間距離を算出する(S 1 8)。

S 1 4で得られたダミー原子の原子間距離と、S 1 8で得られた、対応するリガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子の原子間距離との差の2乗の和であるFの値が一定の範囲以上となるリガンド分子の配座を除去する(S 1 9)。

このステップにより、生体高分子とリガンド分子の水素結合様式及びリガンド分子の配座の可能性を効率的に網羅することができる。

$$F = \sum_{i=1}^n (r_{di} - r_{li})^2$$

とすると、

$$k_a \leq F \leq k_a'$$

(式中、nは水素結合の数を、 $r_{di}$ はi番目のダミー原子間距離を、 $r_{li}$ はリガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子のi番目の原子間距離を、 $k_a$ はFの下限値を、 $k_a'$ はFの上限値を表す。)

である配座以外の配座を除去する。上記の $k_a$ としては、0.6～0.8、 $k_a'$ としては、1.2～1.4が好ましい。

S 1 9で除去されなかったリガンド分子の配座について、前記のFの値が最小になるように、リガンド分子の水素結合性部分の配座を最適化する(S 2 0)。

このステップにより、生体高分子とリガンド分子が安定な水素結合を形成するように、リガンド分子の配座が修正される。

リガンド分子の水素結合性部分に存在するねじれ回転可能な結合のねじれ角を変数として、前記の関数Fの値をFletcher-Powell法(R. Fletcher, M. J. D. Powell,

Computer J., 6, 163 (1968)) を用いて最小化することにより、リガンド分子の水素結合性部分の配座を最適化することができる。

次いで、S 2 0 のステップで最適化したリガンド分子の水素結合性部分の分子内エネルギーを算出して、該分子内エネルギーの値が一定値以上の配座を除去する (S 2 1)。

例えば、AMBER 4.0 の分子力場を用いてリガンド分子の水素結合性部分の分子内エネルギーを算出した場合、該分子内エネルギーが100 Kcal/mol以上となった配座を除去してよい。

上記の S 2 1 までのステップで得られた配座を有するリガンド分子の水素結合性ヘテロ原子の座標と、対応するダミー原子の座標とが一致するように、リガンド分子の原子座標を生体高分子の座標系に置き換える (S 2 2)。

それには、Kabsh の最小二乗法(W. Kabsh, Acta Cryst., A32, 922(1976), W. Kabsh, Acta Cryst., A34, 827(1978))を用いることができる。このようにして、可能な水素結合様式とリガンド分子の水素結合性部分の配座を同時に粗く推定することができる。

次いで、生体高分子とリガンド分子の水素結合性部分との分子間相互作用エネルギー (ファンデルワールス相互作用エネルギー及び静電相互作用エネルギーの和)、及びリガンド分子の水素結合性部分についての分子内エネルギーを算出する (S 2 3)。

生体高分子とリガンド分子の水素結合性部分との分子間相互作用エネルギー  $E_{inter}$  は、リガンド分子中の各原子  $k$  に最も近い三次元格子点の格子点情報のファンデルワールス相互作用エネルギー  $G_{vdw}(k)$  及び静電相互作用エネルギー  $G_{ele}(k)$  を用いて、以下の式から算出することができる。

$$E_{inter} = \sum_k \{ G_{vdw}(k) + G_{ele}(k) \cdot q_k \}$$

(式中、 $q_k$  は原子  $k$  の電荷を表す。)

また、リガンド分子の水素結合性部分の分子内エネルギー  $E_{intra}$  は、既知の方法で公開された既知の力場を用いて算出することができる。例えば、 $E_{intra}$  は、AMBER4.0等の公開された既知の力場を用いて、以下の式により算出できる。

$$E_{intra} = \sum_{Dihedrals} \sum_n V_n / 2 \{ 1 + \cos(n\Phi - \gamma) \}$$

$$+ \sum_{i < j} (A_{ij} / R_{ij}^{12} - B_{ij} / R_{ij}^6) + \sum_{i < j} (q_i q_j / \epsilon R_{ij})$$

(式中、 $V_n$  はねじれ角を構成する4つの原子の原子タイプの並びに対して与えられている定数を、 $n$  はねじれ角回転に対するポテンシャルの対称性を表す定数を、 $\Phi$  はねじれ角を、 $\gamma$  はねじれ角回転に対するポテンシャルの位相(ねじれ角を構成する4つの原子の原子タイプの並びに対して与えられている。)を、 $A_{ij}$  と  $B_{ij}$  はリカンド分子中の  $i$  番目と  $j$  番目の原子の原子タイプの対に対して設定された定数を、 $R_{ij}$  は  $i$  番目と  $j$  番目の原子間の距離を、 $q_i$  はリガンド分子中の  $i$  番目の原子の電荷を、 $q_j$  はリガンド分子中の  $j$  番目の原子の電荷を、 $\epsilon$  は誘電率を表す。)

S 2 3 で算出された分子間相互作用エネルギーと分子内エネルギーとの和が一定値以上となったリガンド分子の配座を除去する (S 2 4)。

例えば、上記のエネルギーの和が1500 kcal/mol 以上となった配座を除去することが好ましい。

S 2 4 で除去されなかった配座を有するリガンド分子の水素結合性部分の構造を最適化する (S 2 5)。

構造最適化計算により、リガンド分子の水素結合性部分のねじれ角、並びに、リガンド分子の位置と方向を最適化することにより、リガンド分子の水素結合性部分の構造を最適化することができる。例えば、以下の式から算出される全エネルギー  $E_{total}$  が最小となるように、Simplex 法 (HITACHI. ライブラリープログラム, SOFSM) 等によって、リガンド分子の水素結合性部分の構造を最適化することができる。

$$E_{total} = E_{inter} + E_{intra} + Whb \cdot Nhb \cdot Chb$$

(式中、 $E_{inter}$  及び  $E_{intra}$  は前記の通りであり、 $Whb$  は重み、 $Nhb$  は水素結合の数、及び  $Chb$  は1個の水素結合による安定化エネルギー (例えば、2.5 kcal/mol) を示す。)

リガンド分子の非水素結合性部分のねじれ回転が可能な結合を、S 1 1 で指定した回転様式に従って回転させることによって、リガンド分子の配座を順次生成させる (S 2 6)。

生成した配座毎に、以後のS 2 7～S 3 0のステップを繰り返す。

次いで、生体高分子とリガンド分子との分子間相互作用エネルギー、及びリガンド分子の分子内エネルギーを算出する(S 2 7)。

上記の分子間相互作用エネルギー及び分子内エネルギーは、S 2 3と同様の方法で算出できる。但し、S 2 3では、リカンド分子の水素結合性部分についてのみ計算を行うが、S 2 7では、リカンド分子全体について計算を行う。

S 2 7で算出された分子間相互作用エネルギーと分子内エネルギーの和が一定値以上となったリガンド分子の配座を除去する(S 2 8)。

上記のエネルギーの和の上限値としては、1500kcal/molが好ましい。

S 2 8で除去されなかった配座を有するリガンド分子全体の構造を最適化する(S 2 9)。

このステップにより、生体高分子とリガンド分子の安定化された複合体、及びリガンド分子の活性配座が得られる。

S 2 5のステップと同様の方法で、リガンド分子の構造を最適化することができる。但し、S 2 5では、リカンド分子の水素結合性部分の構造のみ最適化を行うが、S 2 9では、リカンド分子全体について構造の最適化を行う。S 2 9までのステップで得られた複合体の構造を初期複合体モデルということとする。

生体高分子の配座を変化させて、生体高分子ーリガンド分子の複合体構造を最適化する(S 3 0)。

S 2 9のステップまでは、生体高分子をrigidなものとして扱ってきたが、S 3 0においては、生体高分子の配座を変化させて、初期複合体モデルのエネルギーを極小化させる。公開されている既知のエネルギー極小化計算プログラムAMBERを用いてこのエネルギーを極小化することにより、初期複合体モデルの構造を最適化することができる。また、このステップにおいては、複合体の結晶構造中に見られる全水分子やその他の分子を複合体構造中に配置して、複合体構造を最適化することが好ましい。S 3 0のステップにより得られた複合体の構造を最終複合体モデルということとする。

S 3 0までのステップで得られた生体高分子ーリガンド分子の複合体構造のエネルギーを算出し、該エネルギーの小さい順に複合体構造をランク付けする

(S 3 1)。

最終複合体モデルの構造のうち、最小のエネルギーを与える構造が、多くの場合、既に実験的に得られている複合体構造とよく一致する。従って、エネルギーが最小の構造を正しい複合体構造と考えるのが妥当である。しかし、用いた力場の精度、生体高分子の原子座標の精度、その他の要因によって、複合体のエネルギーの大きさの順位は多少変動するので、エネルギー値の低い順に上位数個の複合体構造を考慮することが好ましい。

また、本発明のより好ましい実施態様においては、生体高分子から非常に多くのダミー原子が作成されることが予想される場合、並びに、リガンド分子がかなり大きな配座の自由度を有するか又は多くのヘテロ原子を有する場合には、S 9のステップでリガンド分子に関する情報を入力した後、リガンド分子の部分構造を指定し、この指定した部分構造についてS 10～S 24までのステップを行って、その部分構造中で不可能な水素結合様式を与えるダミー原子とリガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子の組合せ、及びダミー原子と水素結合を形成し得ないリガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子の情報を保存する。リガンド分子の部分構造は、いかなる構造的な制約を受けることなく任意に決めることができるが、3個以上の水素結合性官能基を含む構造部分が好ましく、その構造部分の配座の自由度の有無は問わない。次に、リガンド分子の全体構造についてS 10～S 31のステップをおこなうが、前記の保存された水素結合性ヘテロ原子を含む組合せ、及び前記の保存されたダミー原子と水素結合性ヘテロ原子の組合せはS 12のステップで作成される対応関係の組合せから除かれる。その結果、試行する組合せ及び配座の数が減り、生体高分子ーリガンド分子の安定複合体の構造探索に要する時間が大幅に短縮される。このような方法をPre-Pruning 法（以下、「PP法」と記す。）と呼ぶこととする。

PP法は、リガンド分子の部分構造中で不可能な水素結合様式やリガンド配座は、リガンド分子の全体構造中에서도不可能であるという推定に基づくものである。PP法によって、得られる生体高分子ーリガンド分子の複合体構造の精度や信頼性に全く影響を与えることなく、探索時間を大幅に短縮することができるようになった。

## 〔例〕

本発明の方法の有効性を示すために、ジヒドロ葉酸還元酵素とその阻害剤またはその基質との複合体の構造探索に本発明の方法を適用してみた。ジヒドロ葉酸還元酵素は、臨床薬の標的として広く研究されている酵素の一つであり、種々の阻害剤分子との複合体の結晶構造が解析されている。例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素－阻害剤メトトレキセート複合体は結晶構造が実験的に解析されていることから、安定な複合体構造の解析のための方法論研究のモデルとして世界的にもよく用いられている。

ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、「DHFR」と記す。）の原子座標としては、プロテインデータバンクエントリー4 DFRから入手できる大腸菌のDHFR－メトトレキセートの二元複合体の原子座標から得られる値を用いた。DHFR－葉酸－NADP<sup>+</sup>の三元複合体の結晶構造に基づき、補因子NADP<sup>+</sup>分子の原子座標を前記の二元複合体の原子座標に付加した。また、非常に強くDHFRに結合して化学的に除去できない2個の水分子以外の全ての水分子は、前記の二元複合体の原子座標から除去した。除去しなかった2個の水分子のうちの一つは、DHFRの21位のトリプトファン及び26位のアスパラギン酸に、他の一つは114位のロイシン及び116位のトレオニンに水素結合している（第8図を参照のこと）。

DHFR中に存在するアミノ酸残基を構成する水素原子の原子座標は、GREENを構成するプログラムの一つであるPDBFILにより算出した。また、Weinerらの*ab initio* 計算の結果（Weiner, S.J., Kollman, P.A., Case, D.A., Singh, U.C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S., Jr. and Weiner, P., J. Am. Chem. Soc., 106, (1984) 765-784）に基づいて、DHFR中に存在するアミノ酸残基を構成する原子に電荷を付与した。但し、27位のアスパラギン酸のカルボン酸側鎖はカルボキシレートアニオンにイオン化されていると仮定した。DHFR中に存在する水素結合性官能基を構成するヘテロ原子について水素結合番号をPDBFILにより付加した。

ジヒドロ葉酸還元酵素－メトトレキセート二元複合体の結晶構造において、阻害剤分子であるメトトレキセートが入っている内孔付近の $12.8 \times 16.8 \times$

11.6 Å<sup>3</sup> の大きさの直方体の領域をリガンド結合領域として指定した。

三次元格子点を上記の直方体領域内に0.4 Å間隔で発生させ、三次元格子点毎に格子点情報を算出した。プローブ原子としては、メトトレキセート分子に存在する水素、炭素、窒素、及び酸素原子を採用した。

上記の直方体領域に突き出したDHFRのアミノ酸側鎖及び主鎖の水素結合性官能基を選択したところ、合計10個の水素結合性官能基が選択された。該水素結合性官能基に対して13個のダミー原子が設定された。

リガンド分子としては、阻害剤メトトレキセート(以下、「MTX」と記す。)と基質ジヒドロ葉酸(以下、「DHF」と記す。)を選択した。

#### [例1]

##### メトトレキセート分子

MTX分子の末端の酢酸基を除いて以下の処理を行った。

MTXの原子座標としては、ケンブリッジ結晶グラフィックスデータベース(Cambridge Crystallographic Database)から入手できる単独時の結晶構造の原子座標を入力した。MTXの各原子の電荷は、MOPAC プログラム中のMNDO法を用いて算出した。尚、MTXのプテリジン環の1位の窒素はプロトン化を受けやすいことが知られているので、プロトン化しているものとして電荷を算出した。第3図の構造式中、丸で囲んだヘテロ原子を水素結合性ヘテロ原子として指定して、水素結合番号を付加した。また、第3図に示したMTX分子構造における矢印のついた結合a～dについては、ねじれ角を結合aについては0～360°の範囲で60°ずつ回転させ、結合bについては0～180°の範囲で60°ずつ回転させ、結合cについては0°又は180°とし、結合dについては180°としてMTX分子の配座を生成させた。

この方法では、i個の水素結合を形成させる場合の水素結合の組合せ数N(i)は以下に示すように膨大な数となる。

$$N(7) = {}_{11}P_7 \times {}_{10}C_7 = 199, 584, 000 \text{通り}$$

$$N(6) = {}_{11}P_6 \times {}_{10}C_6 = 69, 854, 400 \text{通り}$$

$$N(5) = {}_{11}P_5 \times {}_{10}C_5 = 13, 970, 880 \text{通り}$$

$$N(4) = {}_{11}P_4 \times {}_{10}C_4 = 207, 900 \text{通り}$$

一気にMTX分子の全構造をDHFRにドッキングさせることも可能であるが(Iris4D/25ワークステーションで、MTX分子の原子座標入力から複合体の構造の最適化までの処理の所用時間約30時間)、プテリジン環からベンゼン環までのMTX分子の部分構造をDHFRにドッキングさせた後(所要時間約4分強)、その結果に基づいてMTX分子の全構造を考慮して安定複合体構造を探索する(PP法)方が所要時間が短縮された(MTX分子の原子座標入力から複合体構造の最適化までの処理の所要時間約30分)。また、一気にMTX分子の全構造をDHFRにドッキングさせて安定複合体構造を探索した場合も、MTX分子の部分構造をDHFRにドッキングさせ、その結果に基づいてMTX分子の全構造を考慮して安定複合体構造を探索した場合も、同じ安定複合体構造が得られた。

得られた11個の初期複合体モデルのうち、エネルギーが低い順に5個のモデルを選択し、各モデルについてAMBERプログラムを用いてエネルギーを極小化して最終複合体モデルを得た。AMBERプログラムによるエネルギーの極小化により、各モデルのエネルギー値も水素結合数も改良され、また、いくつかのモデルについてランク付けが変化した。これらの事実は、生体高分子構造の局所的な修正の影響が無視できない程大きいことを示唆している。最終的に得られた安定複合体モデルのうち上位のものの水素結合数と総エネルギーを表2に示す。また、最小のエネルギー(-176.71Kcal/mol)を示す最安定複合体モデルを第4図に示す。第4図中、太線はMTXの分子構造を示し、点線はDHFRの分子構造の一部を示す。この複合体モデルにおけるDHFR-MTX複合体の結合様式は、X線結晶解析により得られた複合体の結晶構造におけるDHFR-MTX複合体の結合様式をよく再現していた。また、最安定複合体モデルにおけるMTX分子の配座(第5図の(b))を、単独時の結晶構造におけるMTX分子の配座(第5図の(a))及びDHFR-MTX複合体の結晶構造におけるMTX分子の配座(第5図の(c))とともに第5図に示す。第5図から明らかなように、MTX分子のC5-C6-C9-C10のねじれ角は、単独時の結晶構造においては-139.1°であるのに対し、最安定複合体モデルにおいては25.3°、DHFR-MTX複合体の結晶構造においては28.4°であり、最安定複合体モデルにおけるMTX分子の配座は初期構造からは大きく変わり、複合体の結晶構造中のもの



のと非常によい一致を示した。

〔例 2〕

ジヒドロ葉酸分子

DHFRとその基質であるDHFとの結合様式はX線解析では解明されていないが、酵素反応の生成物であるテトラヒドロ葉酸の立体特異性から、MTXとは異なる結合様式が推定されている。すなわち、DHFRの還元作用によって生成するテトラヒドロ葉酸のC 6 位の水素は、補酵素NADPHからハイドライドイオンとして来るものであることがわかっているが、X線解析されたDHFR-MTX-NADPHの三元複合体の結晶構造におけるMTXのDHFRへの結合様式と同じ結合様式をDHFR-DHF複合体がとると仮定すると、逆の立体構造をもつテトラヒドロ葉酸が生成されることとなり、DHFR酵素反応の立体特異性を説明できなくなる（第 6 図を参照のこと）。

ここでは、こうした先入観を全く入れずに、例 1 と同様のやり方でDHFR-DHFの安定複合体の構造を探索した。但し、DHFの原子座標としては、MTXの単独時の結晶構造の原子座標を基に、原子の置換を行って作成した原子座標を用いた。DHFの各原子の電荷は、例 1 と同様の方法により算出した。また、第 3 図の構造式中、丸で囲んだヘテロ原子を水素結合性ヘテロ原子として指定して、水素結合番号を付加した。

最終的に得られた安定複合体モデルのうち上位のものの水素結合数と総エネルギーを表 2 に示す。最小のエネルギー（-173.46 Kcal/mol）を示す最安定複合体モデルを第 7 図に示す。第 7 図中、太線はDHFの分子構造を示し、点線はDHFRの分子構造の一部を示す。最安定複合体モデルにおけるDHFの配座は、DHFR-MTX複合体の結晶構造におけるMTXの配座とは異なり、プテリジン環の面が裏返ったものであった。最安定複合体モデルにおけるDHFのDHFRへの結合様式は、DHFR酵素反応生成物の立体特異性から推定されるDHFのDHFRへの結合様式（第 8 図の（b））とよく一致した。DHFのDHFRへのこの結合様式は、DHFR酵素反応の立体特異性（第 6 図を参照のこと）をうまく説明できるものである。また、最安定複合体モデルにおけるDHFの配座は、基質類似化合物である葉酸とDHFRとの複合体の結晶構造における葉酸の配座

に非常に近いものであった。

これらの結果は本発明の方法の有効性を示すものである。

表2. ジヒドロ葉酸還元酵素ーリガンド複合体モデル

リガンド	初期複合体モデル		最終複合体モデル	
	水素結合数	総エネルギー (Kcal/mol)	水素結合数	総エネルギー (Kcal/mol)
メトトレキセート	4	-85.01	8	-176.71
	3	-67.32	6	-158.15
	3	-61.27	6	-141.91
ジヒドロ葉酸	3	-80.96	6	-159.20
	3	-76.20	8	-173.46
	3	-63.38	7	-161.45

本発明の方法により、生体高分子ーリガンド分子の安定複合体構造の探索を短時間で行うことが可能になった。

また、本発明の方法により、すべての可能な生体高分子ーリガンド分子の複合体構造の中から、最安定な構造を含む少数の複合体構造を確実に選択できるようになった。

さらに、本発明の方法により、作業者の主観が介入することなしに、生体高分子ーリガンド分子の安定複合体構造の探索を行うことが可能になった。

また、本発明の方法により、信頼性が高く再現性のある生体高分子ーリガンド分子の安定複合体構造の探索が可能になった。

さらに、本発明の方法により、リガンド分子の配座の自由度を考慮し、かつ、分子間相互作用に関する定量的な評価を十分に行った生体高分子ーリガンド分子の安定複合体構造の探索を行うことが可能になった。

さらにまた、本発明の方法により、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合数が少ない場合、例えば、水素結合が1個の場合にも安定複合体構造の探索を行うことが可能になった。

#### 産業上の利用可能性

本発明の方法を用いて、新規に設計したリガンド分子が標的生体高分子とどんな結合様式の複合体を形成しやすいか、その安定性はどの程度かを予測することができ、薬物や活性化合物の設計研究を効率的に行うことができる。

また、本発明の方法を、ある標的生体高分子に対する多数のリガンド候補化合物群に適用することにより、新規リード化合物を探索することができる。

## 請 求 の 範 囲

- 1.(1) 生体高分子中の水素結合性官能基の水素結合の相手となり得るヘテロ原子の位置に設定したダミー原子とリガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子との対応づけを組合せ的に網羅することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式を網羅する第1工程、
- (2) 前記のダミー原子間の距離と前記の水素結合性ヘテロ原子間の距離を比較することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式及びリガンド分子の水素結合性部分の配座を同時に推定する第2工程、及び
- (3) 第2工程で得られた水素結合様式と配座毎に、リガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子とダミー原子との対応関係に基づいてリガンド分子の全原子の座標を生体高分子の座標系に置き換えることにより生体高分子ーリガンド分子の複合体構造を得る第3工程

を含む生体高分子ーリガンド分子の安定複合体の構造を探索する方法。

- 2.(1) 生体高分子中の水素結合性官能基の水素結合の相手となり得るヘテロ原子の位置に設定したダミー原子とリガンド分子の部分構造中の水素結合性ヘテロ原子との対応づけを組合せ的に網羅することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式を網羅する第1工程、
- (2) 前記のダミー原子間の距離と前記の水素結合性ヘテロ原子間の距離を比較することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式及びリガンド分子の部分構造の配座を同時に推定する第2工程、
- (3) 第2工程で得られた水素結合様式と配座に基づいて、前記のリガンド分子の部分構造中で不可能な水素結合様式を与えるダミー原子と水素結合性ヘテロ原子の組合せ、及びダミー原子と水素結合を形成し得ない水素結合性ヘテロ原子を保存する第3工程、
- (4) 第3工程で保存された水素結合性ヘテロ原子を含む組合せ、及び第3工程で保存されたダミー原子と水素結合性ヘテロ原子の組合せを除いて、ダミー原子とリガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子との対応づけを組合せ的に網羅することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式を網羅する

## 第4工程、

(5) 前記のダミー原子間の距離と前記の水素結合性ヘテロ原子間の距離を比較することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式及びリガンド分子の水素結合性部分の配座を同時に推定する第5工程、及び

(6) 第5工程で得られた水素結合様式と配座毎に、リガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子とダミー原子との対応関係に基づいてリガンド分子の全原子の座標を生体高分子の座標系に置き換えることにより生体高分子ーリガンド分子の複合体構造を得る第6工程

を含む生体高分子ーリガンド分子の安定複合体の構造を探索する方法。

3.(1) 生体高分子中の水素結合性官能基の水素結合の相手となり得るヘテロ原子の位置に設定したダミー原子とリガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子との対応づけを組合せ的に網羅することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式を網羅する第1工程、

(2) 前記のダミー原子間の距離と前記の水素結合性ヘテロ原子間の距離を比較することにより、生体高分子ーリガンド分子間の水素結合様式及びリガンド分子の水素結合性部分の配座を同時に推定する第2工程、

(3) 第2工程で得られた水素結合様式を保持しつつ、ダミー原子とリガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子の位置が一致するようにリガンド分子の配座を最適化し、次いで、分子内エネルギーの高いリガンド分子の配座を除去する第3工程、

(4) 第3工程で除去されなかった配座毎に、リガンド分子中の水素結合性ヘテロ原子とダミー原子との対応関係に基づいてリガンド分子の全原子の座標を生体高分子の座標系に置き換えることにより生体高分子ーリガンド分子の複合体構造を得る第4工程、

(5) 第4工程で得られた複合体構造から、リガンド分子中の水素結合性部分の分子内エネルギー及び生体高分子ー該リガンド分子中の水素結合性部分の分子間相互作用エネルギーの高い複合体構造を除去し、次いで、残った複合体構造について構造の最適化を行う第5工程、

(6) 第5工程で得られた複合体構造毎に、リガンド分子の非水素結合性部分の

配座を発生させて新たな複合体構造を得る第 6 工程、及び

(7) 第 6 工程で得られた複合体構造から、リガンド分子全体の分子内エネルギー及び生体高分子ーリガンド分子の分子間相互作用エネルギーの高い複合体構造を除去し、次いで、残った複合体構造について構造の最適化を行う第 7 工程

を含む生体高分子ーリガンド分子の安定複合体の構造を探索する方法。

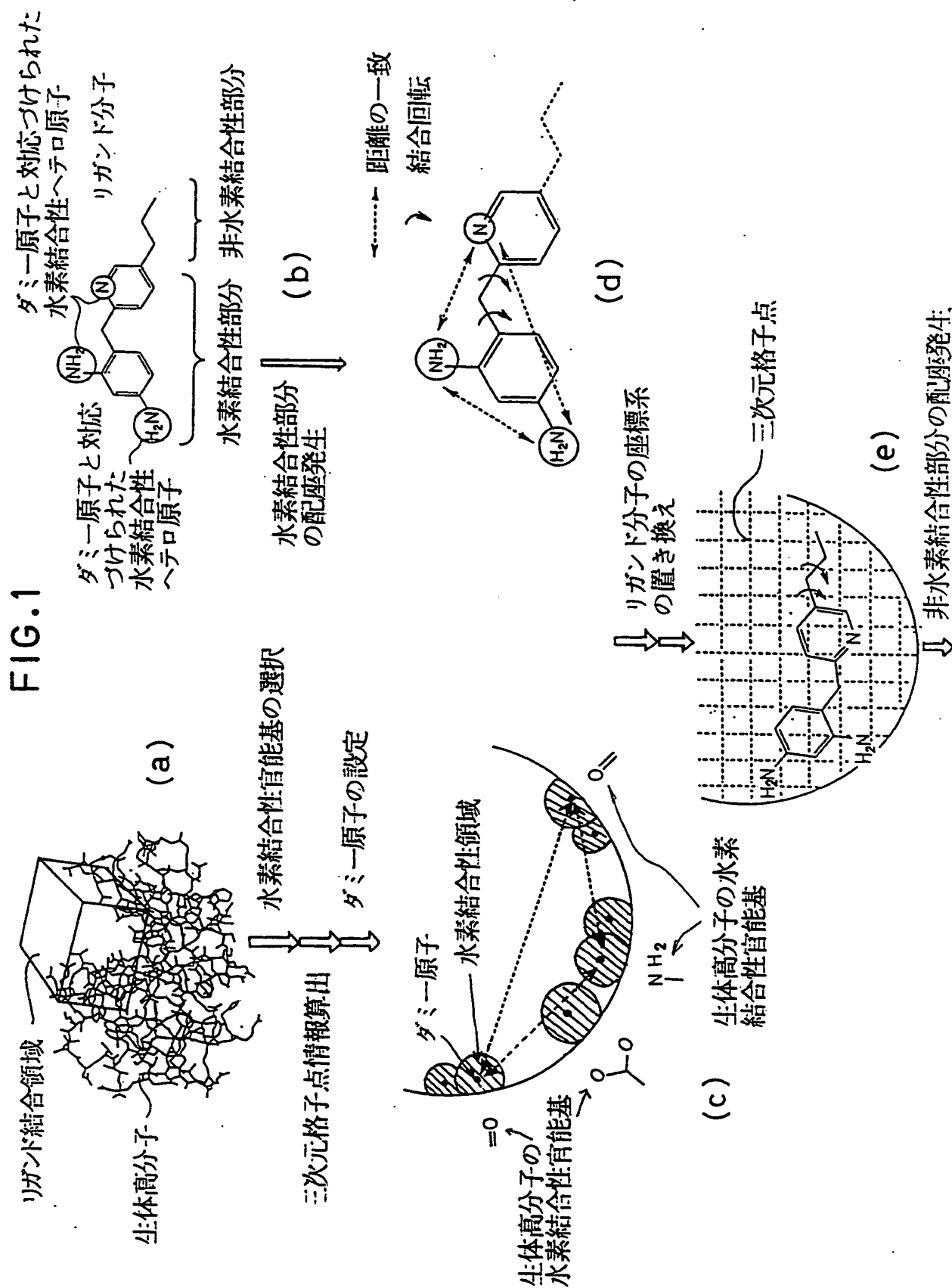


FIG. 2

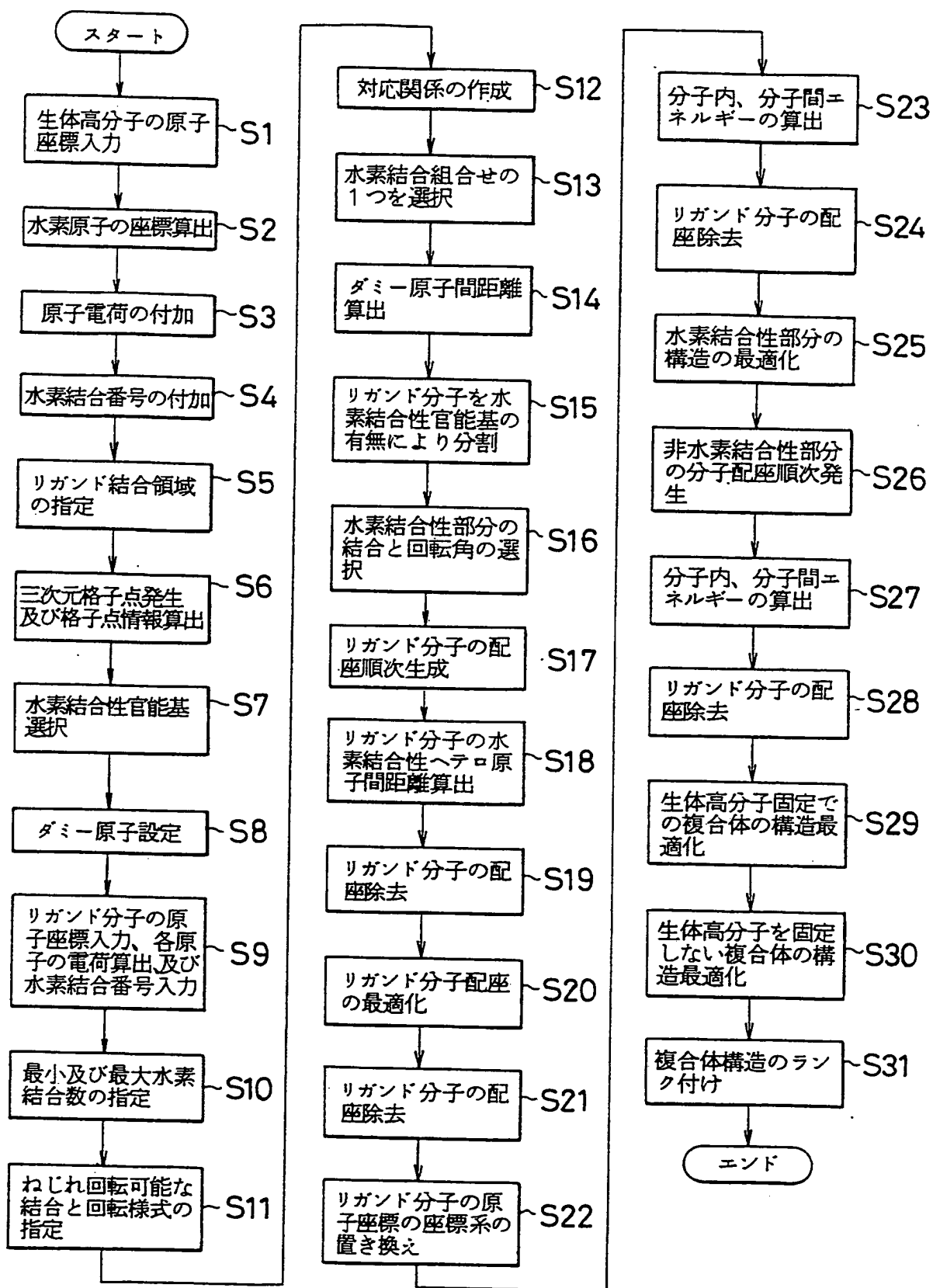




FIG. 3

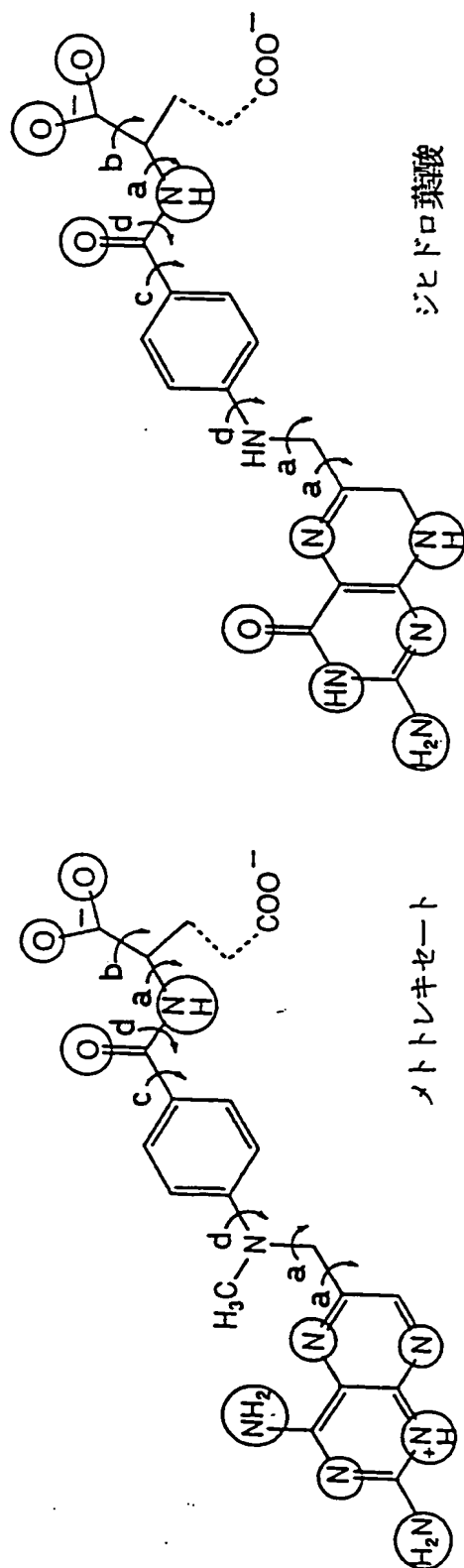


FIG.4

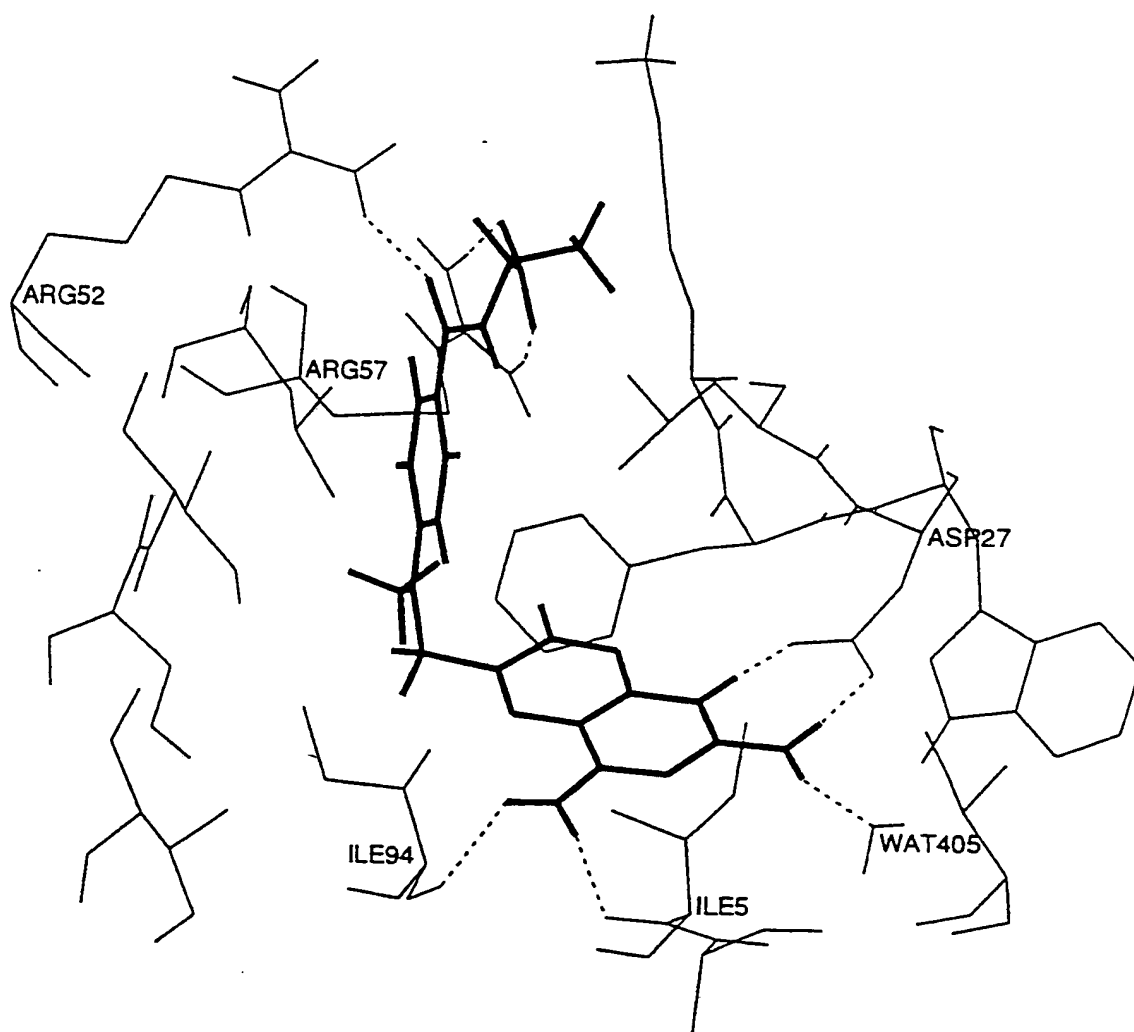


FIG. 5

メトトレキサートの配座

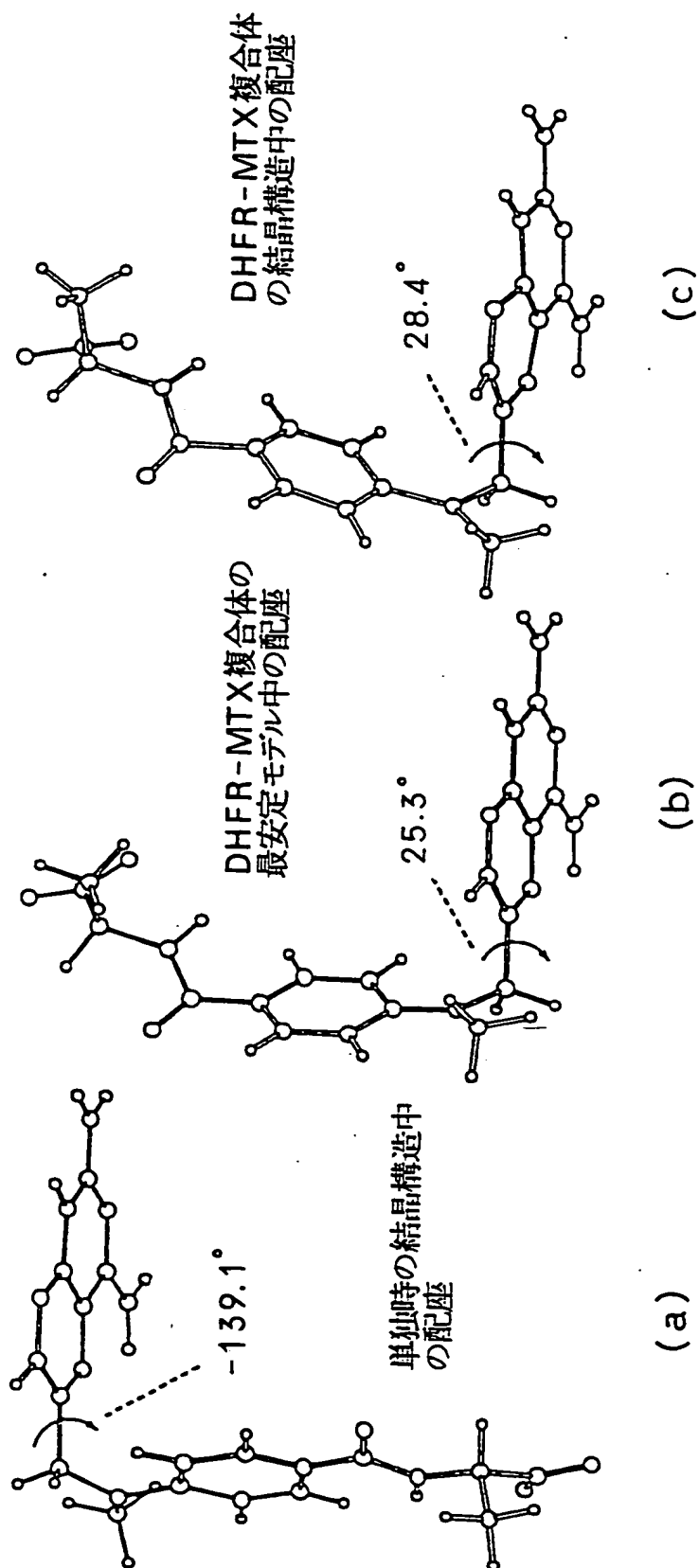


FIG. 6

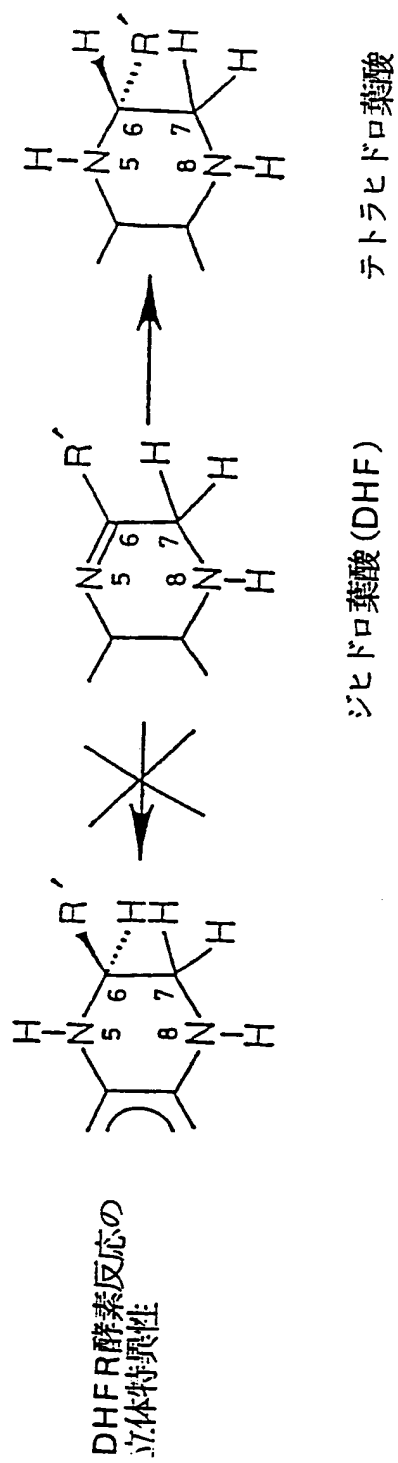


FIG. 7

DHFR-DHF 複合体の最安定モデル

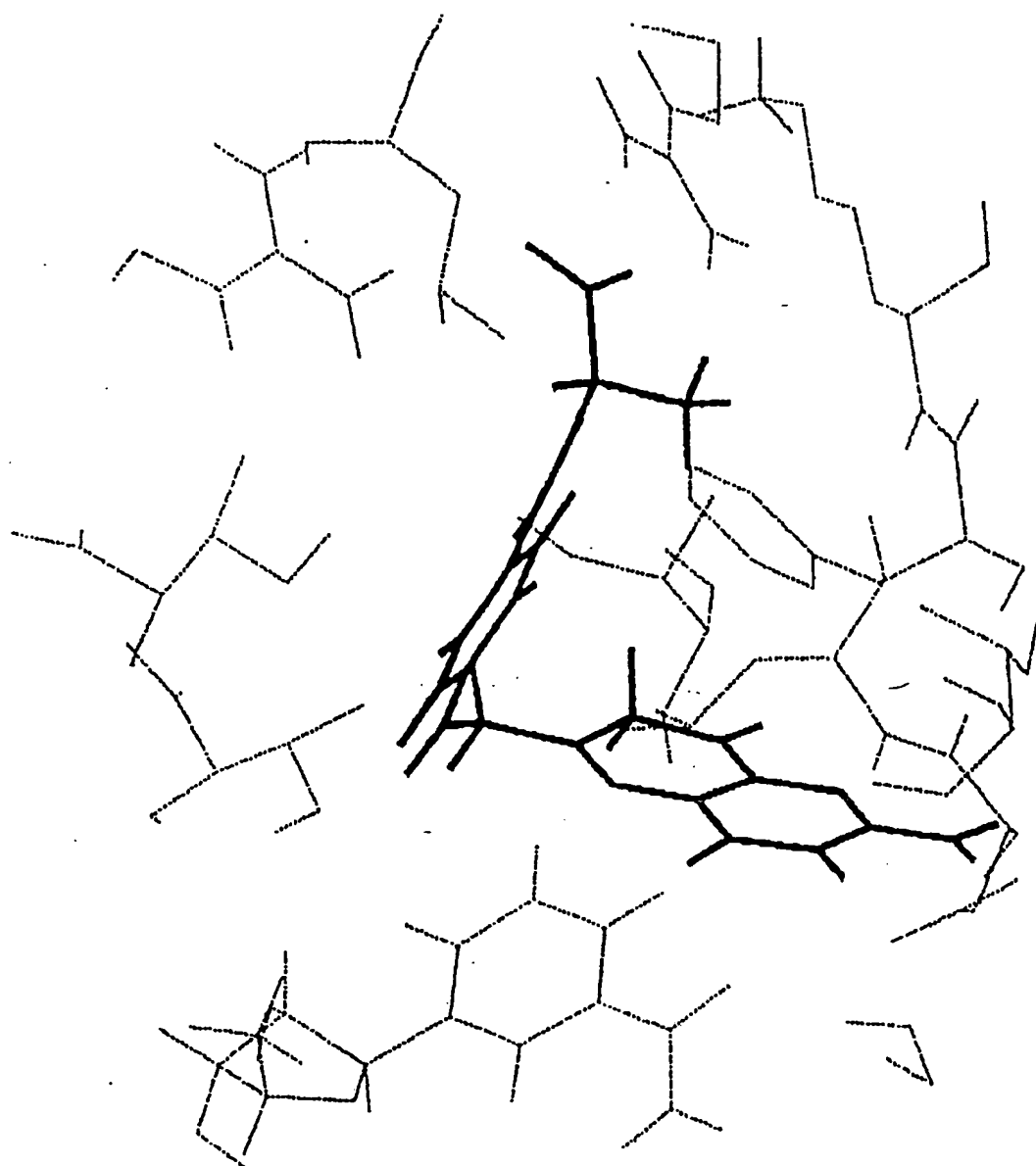
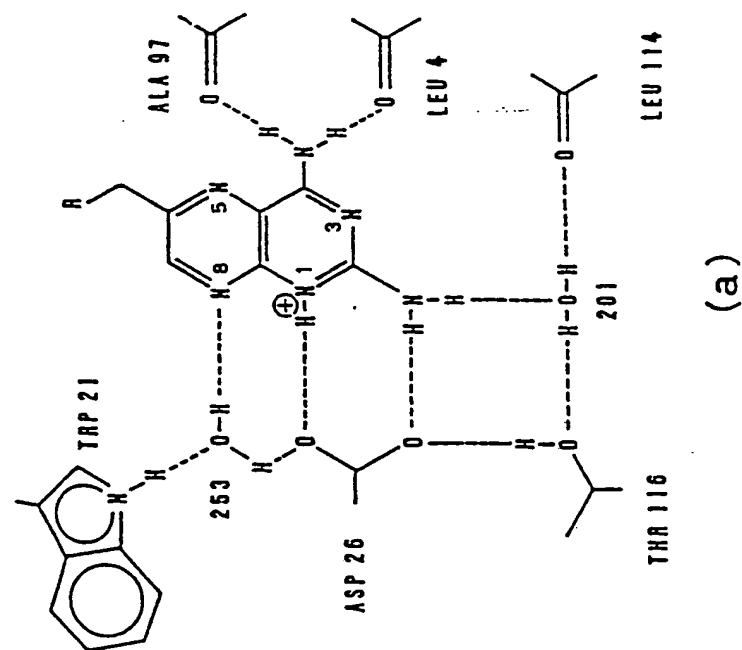
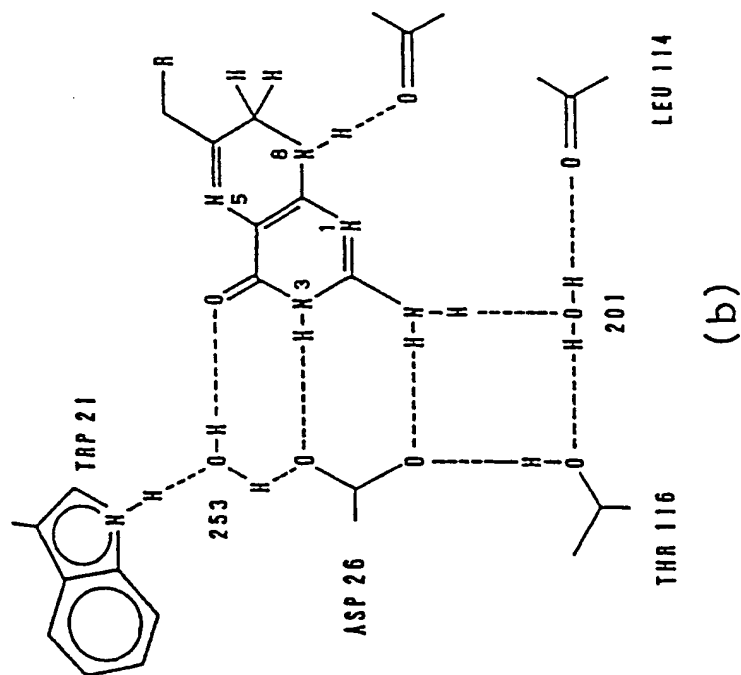


FIG. 8

DHFR-MTX複合体の  
結晶構造中のMTXの結  
合様式



DHFR酵素反応生成物の  
立体特異性から推定される  
DHFの結合様式



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/00365

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>5</sup> G06F15/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>5</sup> G06F15/40

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926 - 1992

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1992

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 61-223941 (Shadan Hojin Kagaku Joho Kyokai), October 4, 1986 (04. 10. 86)	
A	JP, A, 58-175077 (Nihon Kagaku Gijutsu Joho Center), October 14, 1983 (14. 10. 83)	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

June 24, 1993 (24. 06. 93)

Date of mailing of the international search report

July 20, 1993 (20. 07. 93)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> G06F15/40

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> G06F15/40

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1992年

日本国公開実用新案公報 1971-1992年

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の  
カテゴリー\*

引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示

関連する  
請求の範囲の番号

A

JP, A, 61-223941 (社団法人 化学情報協会,  
4. 10月, 1986 (04. 10. 86))

A

JP, A, 58-175077 (日本科学技術情報センター,  
14. 10月, 1983 (14. 10. 83))☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日  
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献  
(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日  
の後に公表された文献「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と  
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため  
に引用するもの「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規  
性又は進歩性がないと考えられるもの「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文  
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性  
がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 06. 93

国際調査報告の発送日

20.07.93

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

水谷好男

5 L

7 0 6 0

電話番号 03-3581-1101 内線

3563



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

### **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☒ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (11/15/10)**